

## BACTERIOLOGIA Y SEROLOGIA DE LA INFECCION LISTERICA EN LA ABORTADORA HABITUAL

Por el Dr. EDO E. BALSECHI

La infección listérica es una entidad de mucho interés en Medicina Humana y Veterinaria, pero su estudio afronta la dificultad que el aislamiento de la bacteria causal, única forma de establecer un diagnóstico de certeza, exige una técnica larga y no suficientemente satisfactoria.

La Serología, que podría ser una valiosa ayuda al diagnóstico, debido a la composición antigénica de la bacteria, tiene alto grado de inespecificidad que obliga a tomar con recaudos sus resultados.

Las afirmaciones anteriores son particularmente ciertas cuando, como en el caso de nuestro grupo de trabajo, se debe investigar cuál es el papel de la infección listérica, en el aborto habitual, en la infección perinatal o como posible causa de mortinatos, neonatos. El estudio bacteriológico de estas formas clínicas exige trabajar con medios de cultivo altamente selectivos, que permitan el crecimiento más o menos irrestricto de la bacteria buscada y que a la vez impida o frene el desarrollo de la flora microbiana acompañante. Los materiales de elección para el estudio de la abortadora habitual son el moco cervical y el flujo vaginal, pero además, como la bacteria se excreta por vía intestinal, la materia fecal es el tercer material de importancia, que se hace imprescindible, cuando se necesitan realizar estudios epidemiológicos. Estas breves consideraciones sirven para enmarcar la problemática bacteriológica a resolver.

De las bacterias que acompañan habitualmente la microflora en los materiales a examinar, el grupo enterococo condensa la mayoría de las dificultades existentes, cuando se debe separar grupos de bacterias con ciertas características similares. Y, en efecto, existen muchas similitudes entre los grupos enterococo y listeria: poseen parcelas antigénicas comunes, ambos son Gram Positivos; algunos antibióticos tienen acción semejante, desarrollan y forman colonias a 4°C y la mayoría de las sustancias inhibidoras tienen acción común sobre ellos. Además, debemos agregar otra particularidad entre estos dos grupos de bacterias y es que

los metabolitos que producen el grupo enterococo, actúan de forma inhibidora sobre el grupo listeria.

En conocimiento de todas estas dificultades, cuando iniciamos nuestro estudio en 1970, nos apoyamos en el esquema que en ese momento tenía más aceptación y que era el que Gray había desarrollado en 1960. Sintéticamente fue el siguiente:

Siembra inicial en placas de Agar McBride y simultáneamente en caldo Tryptosa fosfato, el que se utilizó para efectuar la técnica de enriquecimiento a 4°C. Incubación durante 4 meses, con repiques semanales en placas de McBride y búsqueda de las colonias sospechosas mediante la técnica de transiluminación a 45°C.

No satisfechos con los resultados obtenidos con el medio de McBride, decidimos intentar, a partir de 1972, el mejoramiento del medio cultivo, para lo cual experimentamos diversos inhibidores y otros medios de cultivo.

En ese período ensayamos medios con telurito de potasio en diferentes concentraciones, tiocianato de potasio, acriflavina, furacina, azida sódica, acetato de talio, además de algunas combinaciones de antibióticos (eritromicina-polimyxina, rifocina-ácido nalidíxico, etc.). Los resultados fueron diversos, pero ninguna de ellos resultó superior a los que obteníamos con el medio McBride.

El VI Simposium sobre Problemas de Listeriosis, realizado en setiembre de 1974, fue de significativa importancia y ayuda para nosotros; los trabajos de Ralovich y colaboradores nos resultaron particularmente útiles. Este investigador concibió un medio de cultivo constituido por una base de trypticase agar, enriquecida con suero bovino inactivado en una concentración final del 5 % y como inhibidores utilizó una mezcla de trypaflavina (10 mcgrs x ml) y ácido nalidíxico (50 mcgrs x ml). En nuestra experiencia la concentración de los inhibidores es el punto crítico y su ajuste correcto debe ser realizado experimentalmente. Pequeñas concentraciones de los inhibidores hacen variar sensiblemente los resultados. La ventaja que hemos podido comprobar con este medio, es que no tiene la acción frenadora de crecimiento que se observa en los medios que poseen feniletanol.

Durante el período que abarca nuestro estudio, hemos aislado 47 cepas de *Listeria monocitógenes*, pertenecientes a pacientes con la sintomatología ya mencionada. La distribución por materiales fue la siguiente: 35 de moco-cervical, 8 de materia fecal, 2 de meconio y 2 de restos placentarios. La distribución por serotipos fue la siguiente: tipo 1: 8 cepas; tipo 4a: 18 cepas; tipo 4b: 12 cepas, y tipo 4ab: 9 cepas.

El serotipo más virulento es la 4a, de la cual nosotros conseguimos el mayor número de aislamientos.

### **Técnica de enriquecimiento en frío**

En el esquema de investigación bacteriológica, la técnica de enriquecimiento en frío ocupa un lugar preeminente. Ya en 1948 Gray había observado que cuando se debía aislar la bacteria de cerebros de bovinos, su aislamiento resultaba dificultoso, consiguiendo un desarrollo muy escaso y a veces éste no se producía. En cambio si el material era guardado en la heladera durante varios días, obtenía un desarrollo abundante. Gray explicó este curioso fenómeno, suponiendo que existiera en los tejidos una sustancia inhibidora o frenadora del crecimiento de la bacteria, la que sería inestable a la temperatura de 4°, resultando destruida después de 10 a 12 días de exponerla a esa temperatura. Seeliger, Kapelmacher, Ortel, Ralovich, Girard Osebold y la mayoría de los autores coinciden en la importancia de esta técnica.

Según Osebold, mediante el enriquecimiento en frío se puede incrementar en un 50 % los hallazgos. Seeliger estima que en algunos materiales el incremento puede llegar a un 100 %. Nuestra experiencia es totalmente coincidente con la de los autores citados y salvo un caso de aislamiento realizado a las 48 horas en material de meconio, todos fueron conseguidos en un plazo mayor de 60 días (80 %) y en algunos casos después de 5 meses de incubación y repiques. Otros grupos de trabajo europeos, han comunicado aislamientos después de los 8, 10 y 12 meses. A raíz de estas observaciones y de acuerdo a las posibilidades de nuestra infraestructura de trabajo, hemos prolongado los estudios de los materiales a un plazo de 6 meses.

En la búsqueda por mejorar el esquema de trabajo, en 1979 introducimos una modificación al medio que empleábamos para el enriquecimiento en frío, cambiando el caldo tryptosa fosfato, por caldo tryptosa con 5 % de suero bovino y agregando inhibidores en concentraciones similares a las que se utilizan en el medio de Ralovich. Los resultados experimentales fueron satisfactorios y en el término de un año aumentamos francamente el ritmo de aislamiento (17 sobre un total de 47, un 33 % del total de lo conseguido en los 9 años restantes).

### Identificación

El siguiente es el esquema que utiliza nuestro laboratorio:

- 1) La primera y más simple: la de la catalasa. *Todas las cepas son Catalasa Positiva S.* y la de *Motilidad* con su crecimiento típico en agar blando, todas las cepas son móviles excepto un serotipo muy raro, el tipo 5.
- 2) Pruebas bioquímicas: No forman indol, no producen hidrógeno sulfurado, no reducen los nitratos a nitritos.

### Comportamiento frente a los azúcares:

#### *Acidifican*

Glucosa  
Maltosa  
A-esculeína  
d-Levulosa

#### *No acidifican*

Manitol  
Arabinosa  
Adonitol  
Inulina

Dentro del esquema de identificación las *Pruebas de Virulencia* tienen singular importancia, ya que es la única manera de saber si nos encontramos frente a una cepa con poder de agresión y así estar implicada en un proceso de infección listérica. Existen cepas de *Listeria monocitógenas* sin poder virulento, que no deben ser consideradas como agente etiológico en los cuadros de listeriosis.

Las cepas virulentas de *Listeria monocitógenas* producen una hemolisina, de composición química semejante a la estreptolisina, que produce beta hemólisis. Todas deben ser letales para una laucha con una D.L. de  $10^6$  y en un plazo que varía de 24 a 72 horas, dependiendo del serotipo.

Producen Keratoconjuntivitis en el ojo del conejo. En nuestro laboratorio efectuamos solamente las dos primeras, por su comodidad y por ser criterio suficiente.

### Serología de la infección listérica

Como ya lo dijimos al comienzo, la serología de la infección listérica tropieza con el serio escollo, que la composición antigénica del soma bacteriano, tiene parcelas comunes a un numeroso grupo de Bacterias Gram positivas, la mayoría de las cuales son parte habitual de la microflora del hombre o del animal.

Este antígeno común se lo designa como antígeno de Rantz y lo poseen: el grupo Enterococo, *S. Epidermidis*, *S. Aureus*, Streptococcus grupo B y C, Streptococcus Viridans y algunas especies de Corynebacteriáceas. Esta es sin duda la causa determinante de la inespecificidad de la serología listérica.

A lo largo de nuestro trabajo, hemos ensayado diferentes técnicas: Aglutinación rápida en placas, aglutinación lenta en tubos, Reacción de Fijación del Complemento y también Inmunofluorescencia Indirecta. Nuestra experiencia fue la siguiente:

La aglutinación rápida en placas, tiene un valor muy limitado, por la conocida tendencia a autoaglutinar que tiene la Listeria; con esta técnica se hace mucho más manifiesta y da muchas veces falsos títulos muy elevados.

Los títulos flagelares (H) de 1/400 o superiores pueden tener significación, siempre que el antígeno sea recientemente obtenido y en su preparación haya sido sometido al ultrasonido, con lo que disminuye en forma franca la tendencia de autoaglutinación.

La aglutinación lenta en tubos, brinda resultados más confiables, siempre que en la preparación del antígeno se tomen los recaudos a que hacíamos mención anteriormente. Con esta técnica pueden tener significación los títulos de 1/320 o superiores.

Se impone una profundización sobre este tema: Cuando se estudió la composición antigénica del soma de la Listeria, se pensó que la inespecificidad serológica debía quedar circunscripta a los títulos somáticos (O) y que los títulos de aglutininas flagelares (H) deberán ser específicos, pero las evidencias mostraban que esto no ocurría. Nosotros, en un trabajo anterior, demostramos que los títulos de aglutininas flagelares, descienden en dos y tres diluciones, si previamente saturamos el suero a ensayar, con antígeno somático.

La explicación es que en la preparación del antígeno flagelar, por la técnica clásica, se obtiene un antígeno con una porción del soma bacteriano, causante de los títulos de aglutinación inespecífica.

La microscopía electrónica comprobó visualmente, lo que nos indicaba la serología.

*La Reacción de Fijación del Complemento* que nosotros incorporamos a partir de 1979, utilizando el antígeno de Seeliger es, dentro de las pruebas que buscan medir la respuesta humoral, la más confiable, con la salvedad que títulos bajos o negativos *No Excluyen Infección*. Los títulos superiores a 1/10 deben ser considerados como respuesta serológica específica.

*Inmunofluorescencia Indirecta*: Una publicación realizada en nues-

tro país durante el año 1979, que comunicaba haber obtenido buenos resultados con esta técnica, nos impuso la necesidad de ensayarla, a pesar de que ha sido excluida por todos los grupos de investigación que más han aportado a esclarecer sobre esta enfermedad (Gray, Seeliger, Kapelmacher, Bojsen-Moller, Larsen, etc.) y que además no existe fundamento técnico para poder pensar de forma diferente. Los resultados obtenidos, reproduciendo la técnica mencionada, fueron inferiores a los que teníamos con la aglutinación lenta en tubos.

En la búsqueda de una reacción indirecta específica no debemos de olvidar que es un parásito intracelular facultativo, tal como lo es *Brucella* y *Micobacterium* y el nivel de respuesta humoral y la respuesta tisular pueden ser diferentes.

En la actualidad, diferentes grupos de investigadores tratan de conseguir un antígeno flagelar puro o una parcela somática específica, que permita responder adecuadamente a los interrogantes clínicos y epidemiológicos. En este camino Habs en 1974 y Kunkel y Neuman en 1977, desarrollaron una técnica por ultracentrifugación para obtener un antígeno flagelar libre de las parcelas somáticas. Las comprobaciones de la microscopía electrónica demostraron que el antígeno así obtenido estaba constituido únicamente por el flagelo de la bacteria. Nosotros, continuando los trabajos de los investigadores mencionados, conseguimos un antígeno flagelar, al que luego sometimos a concentración por diálisis, con el objeto de explorar la respuesta a la infección a nivel celular. La prueba experimental la realizamos sobre un lote de conejos, utilizando testigos positivos (animales con infección comprobada) y testigos negativos (animales con bacteriología y serología negativa R. F. del C.). Los resultados fueron buenos y en nuestra opinión, es un camino que se debe continuar investigando.

#### B I B L I O G R A F I A

1. BOJSEN-MOLLER, J.: Human Listeriosis: Diagnostic, Epidemiological and Clinical Studies. Costers Bogtrykkeri- Copenhagen, 1971.
2. DEVALLEZ, M.; CARLIER, Y.; BCUT, D. and MARTIN, G. R.: Purification of a Surface-Specific Soluble Antigen from *Listeria monocitogenes*. *Infect. and Immunity*, 25 (3): 971, 1979.
3. GRAY, L.M. and KILLINGER, A.: *Listeria monocitogenes* and Listeric Infections. *Bact. Reviews*; vol. 30, Nº 2, 1966.
4. LARSEN HOLGER, E.: *Listeria monocitogenes*. Studies on Isolation. Techniques and Epidemiology. Carl Mortensen. Copenhagen, 1969.
5. KAPELMACHER, E. H.; MASS, D. E. and VAN NOORLE JANSSEN, L.: Occurrence of *Listeria monocitogenes* in faeces of pregnant women with and without

- direct animal contact. In VI Symposium of Problems of Listeriosis. 214-216 Edited by M. Woodbine. Leicester University Press, 1974.
6. VON KUNKEL and NAUMANN. Zur Problematik der Serodiagnostik der Listeriose. Deutsch. Ger wessen 29: 1611-1613, 1974.
  7. LIBONATTI, E.; MANZULLO, A.; BALSECHI, E. E. y LIBONATTI, O.: Estudio crítico de la serología de la infección listérica. Rev. Arg. de Enf. Trans. Nº 2; 95-102, 1979.
  8. OSEBOLD, J. W.: Some thoughts on the epidemiology of listeriosis. In: Second Symposium on Listeric Infection. Ed. by M. L. Gray, 1963, 73-84 Bozeman.
  9. PATOCKA, F.; SCHLINDLER, J. and MARA, M.: Studies of the patogenicity of *Listeria monocitógenes*. Zentr. Bakteriол. Parasitenk. 174: 586-593, 1959.
  10. POTEI, J. and DEGEN, L.: Zur Serologie Und Immunobiologie der Listeriose. Zentr. Bakteriол. Parasitenk 180: 61-70, 1960.
  11. SEELIGER, H. P. R.: Listeriose, 2nd ed. Hafner Publishing, Inc. New York, 1958.